

Ponieważ ośrodkowy układ nerwowy (OUN) nie ma możliwości magazynowania substancji odżywczych (glukozy) czy związków wysokoenergetycznych (ATP), to jego prawidłowe funkcjonowanie zależy m.in. od zachowania odpowiedniego przepływu krwi. Przy masie stanowiącej 2% całkowitej masy ciała (średnio ok. 1400 g) mózg w ciągu minuty zużywa ok. 0,43 mmol glukozy i 20% pobieranego przez organizm tlenu, otrzymując ok. 13–15% (900–1000 ml) całkowitej pojemności minutowej serca (Traczyk, 2001). Po przerwaniu dopływu krwi zawartość ATP w mózgu gwałtownie maleje w ciągu 4 min (Krause i wsp., 1988). Oprócz spadku energii i glukozy wynikiem zaburzeń krążenia mózgowego jest akumulacja produktów przemiany materii. W rezultacie dochodzi do uszkodzenia komórek – najpierw czynnościowego, a potem strukturalnego. Z badań u ludzi wynika, że prawdopodobieństwo wystąpienia zawału mózgu jest wyższe niż 95%, jeśli CBF (mózgowy przepływ krwi, ang. *Cerebral Blood Flow*) spadnie poniżej 25% normy, a przy CBF > 50% wartości prawidłowych to prawdopodobieństwo nie przekracza 5% (Heiss i wsp., 2001).

W patofizjologii niedokrwienia mózgu i następowej reperfuzji istotną rolę przypisuje się wielu różnym czynnikom, m.in. ekscytotoksyczności, wolnym rodnikom, dysfunkcji mitochondriów, hamowaniu translacji, aktywacji enzymów proteolitycznych, indukcji opóźnionej śmierci komórkowej, zapaleniu, uszkodzeniu bariery krew–mózg (White i wsp., 2000; Mergenthaler i wsp., 2004). Wszystkie te zjawiska pozostają z sobą w złożonych związkach przyczynowo-skutkowych. Z uwagi na skomplikowany charakter tych interakcji, w niniejszym rozdziale zasygnalizowane zostaną jedynie najważniejsze elementy kaskady zdarzeń uruchamianych przez niedokrwienie – szczegółowe ich omówienie znacznie wykracza poza ramy tej publikacji.

Progi niedokrwienia, koncepcja penumbry

Przerwanie przepływu krwi powoduje wypadanie poszczególnych funkcji komórek nerwowych, w kolejności zależnej od stopnia niedokrwienia. Choć trudno jest porównywać wyniki uzyskane w różnych badaniach (różne modele niedokrwienia, różne rodzaje znieczulenia, różne gatunki zwierząt – inna gęstość neuronów), stwierdzono jednak istnienie pewnego wzorca wrażliwości na niedokrwienie (Back, 1998).

Najbardziej czuła jest synteza białek – przy przepływie 0,55 ml/g/min spada o ok. połowę, a poniżej 0,35 ml/g/min następuje jej kompletne zahamowanie. Z kolei zużycie glukozy przejściowo wzrasta przy perfuzji 0,35 ml/g/min, po czym przy 0,25 ml/g/min gwałtownie spada. Koreluje to ze wzrostem stężenia mleczanów i narastaniem kwasicy, która jest już znaczna przy 0,26 ml/g/min, kiedy zaczynają maleć stężenia ATP i fosfokreatyny. Wewnątrzkomórkowy stosunek stężeń Na^+ do K^+ rośnie przy wartościach przepływu 0,10–0,15 ml/g/min, zmiany stężeń jonowych zaś w przestrzeni zewnątrzkomórkowej zachodzą przy ok. 0,06–0,15 ml/g/min – m.in. wtedy dochodzi też do spadku stężenia Ca^{++} wskutek otwarcia kanałów wapniowych umożliwiających napływ tych jonów do wnętrza komórek. Na poziomie funkcjonalnym najpierw dochodzi do zahamowania aktywności bioelektrycznej ocenianej za pomocą EEG (0,15–0,23 ml/g/min) i zaniku potencjałów wywołanych (0,15–0,25 ml/g/min). Spontaniczna aktywność neuronów znika przy przepływie ok. 0,18 ml/g/min, przy czym ten próg jest różny w różnych populacjach neuronów (0,006–0,22 ml/g/min). Do ujawnienia się odwracalnego niedowładu dochodzi przy 0,23 ml/g/min, a przy 0,17–0,18 ml/g/min neurologiczne objawy ubytkowe stają się nieodwracalne. Także zmiany w uwalnianiu neuroprzekazników zależą od stopnia upośledzenia przepływu krwi: do ok. 0,2 ml/g/min są uwalniane zarówno hamujące, jak i pobudzające neurotransmittery (Hossmann, 1994; Back, 1998).

Skutkiem zaburzeń metabolicznych jest wzrost osmolarności wnętrza komórek, co powoduje zwiększony napływ wody i – w rezultacie – obrzęk komórek. Można to wykazać m.in. w DWI (ang. *Diffusion-Weighted Imaging*) – intensywność sygnału rośnie przy wartości perfuzji ok. 0,41 ml/g/min. Zmiany histologiczne ujawniają się po długim czasie. Przy trwałym zamknięciu tętnicy środkowej mózgu progiem pannekrozy jest przepływ 0,17–0,24 ml/g/min, a przy kilkugodzinnym upośledzeniu przepływu – ok. 0,12 ml/g/min. Do selektywnej śmierci neuronów może dochodzić już poniżej 0,80 ml/g/min. Pamiętać jednak należy, że wartości podanych progów zależą od czasu trwania niedokrwienia – rosną wraz z wydłużaniem się tego okresu (wzrasta wrażliwość na niedokrwienie). I tak, do nieodwracalnego zahamowania spontanicznej aktywności neuronalnej na początku niedokrwienia dochodzi przy przepływie 0,05 ml/g/min, ale po 2 godz. – już przy 0,12 ml/g/min. Jedynie próg zahamowania syntezy białek nie zmienia się zbytnio (Hossmann, 1994).

Na podstawie badań funkcjonalnych stworzono pojęcie penumbry. Pod koniec lat siedemdziesiątych XX wieku wykazano, że do zaburzeń aktywności EEG i potencjałów wywołanych dochodzi przy znacznie większym przepływie krwi niż konieczny do zachowania przez błonowego gradientu potasowego (Symon i wsp., 1977). Sugerowało to, że możliwy jest stan, gdy neurony są czynnościowo nieme, ale strukturalnie nietknięte. Obszar zawarty pomiędzy *core* (strefą centralną zawału) a prawidłową tkanką został nazwany penumbra.

Według najczęściej używanej definicji, penumbra jest to ten obszar tkanki nerwowej otaczającej *core*, w którym perfuzja jest zmniejszona i dochodzi do spadku zasobów energetycznych na tyle dużego, że nie jest możliwe zachowanie prawidłowej czynności elektrycznej komórek, ale wystarczy dla utrzymywania prawidłowej czynności kanałów jonowych. Pozwala to na zachowanie integralności komórek (Astrup i wsp., 1981). Uważa się, że penumbra jest obszarem tkanki zagrożonej, ale możliwej do uratowania – stąd podejmowanie prób trombolizy czy wczesnej rewaskularyzacji w leczeniu udaru niedokrwinnego mózgu.

Penumbra jest strukturą dynamiczną. W jej obrębie dochodzi do stopniowego spadku przepływu krwi i narastania zaburzeń metabolicznych oraz do aktywacji wielu procesów molekularnych. Z czasem obszar penumbry maleje, a powiększa się strefa zawału. W modelu trwałego zamknięcia tętnicy środkowej mózgu u szczura wykazano, że o ile po 30 min niedokrwienia obszar penumbry jest dwukrotnie większy od strefy pozbawionej ATP, o tyle po 2 godz. – już tylko 1,4 razy, a po 7 godz. całkowicie zanika (Hossmann i wsp., 1994). Z kolei z badań u ludzi przeprowadzonych za pomocą PET (ang. *Positron Emission Tomography*) wynika, że tkanka w bezpośred-

nim otoczeniu zawału może pozostawać żywa w sensie metabolicznym nawet do 48 godz., ale potem zachodzą nieodwracalne zmiany (Heiss i wsp., 1992). Istnieje przy tym duża zmienność osobnicza.

Postępujące zmiany w penumbry wynikają nie tylko z samego zmniejszenia perfuzji. Neurony są również narażone na działanie innych czynników uszkodzających, których źródłem są też sąsiednie komórki: glutaminian i związana z nim ekscytotoksyczność, fale depolaryzacji, tlenek azotu (NO), wolne rodniki powodujące stres oksydacyjny, cytokiny zapalne itp.

W związku ze znacznym postępowaniem, jaki dokonał się w badaniach nad patofizjologią niedokrwienia mózgu, Sharp i wsp. (2000) zaproponowali wyróżnienie kilku penumbr definiowanych na podstawie dominujących w ich obrębie zdarzeń na poziomie molekularnym. Są to: 1) strefa selektywnej śmierci neuronów jako zewnętrzna granica zawału; 2) strefa zdenaturowanych białek określona przez indukcję ekspresji białek szoku cieplnego (HSP, ang. *Heat-Shock Protein*) w neuronach; 3) strefa trwale upośledzonej perfuzji i utlenowania charakteryzująca się indukcją czynnika transkrypcyjnego HIF-1 (ang. *Hypoxia-Inducible Factor*) i – najbardziej zewnętrznie położona – 4) strefa indukcji przez fale depolaryzacji genów odpowiedzi wczesnej – głównie *c-fos*.

Ekscytotoksyczność

W ciągu pierwszych minut po niedokrwieniu dochodzi do uwalniania glutaminianu (Glu) z zakończeń presynaptycznych neuronów i astrocytów, przez co stężenie zewnątrzkomórkowe Glu gwałtownie wzrasta: z ok. 7 μ M do 180 μ M w ciągu 20–30 min w modelu ogniskowego niedokrwienia (Takagi i wsp., 1993; Slevin i wsp., 2005). Prowadzi to nadmiernej stymulacji receptorów glutaminergicznych. Są dwie klasy tych receptorów – metabotropowe (mGlu) związane z białkami wiążącymi GTP i jonotropowe (NMDA – otwierające kanały Ca^{++} , AMPA i KA – otwierające kanały Na^{+}). Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Na^{+} powoduje m.in. odwrócenie kierunku przepływu jonów przez wymiennik $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{++}$, co dodatkowo zwiększa stężenie Ca^{++} wewnątrzkomórkowego i nasila jego wpływ cytotoksyczny. Napływ Ca^{++} i Na^{+} z następowym, biernym napływem Cl^{-} i wody, powoduje obrzęk, przerwanie błony komórkowej i martwicę. Z kolei aktywacja mGlu, poprzez wtórne przekazy, prowadzi do hydrolizy fosfatydyloinozytolu, aktywacji fosfolipazy (PL) D, tworzenia cAMP oraz modulacji czynności kanałów wapniowych i potasowych. Ostatecznie dochodzi do olbrzymiego wzrostu (o trzy rzędy wielkości) wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{++}

(z ok. 70 nM do ok. 30 μ M). Ca^{++} aktywuje też liczne enzymy, w tym PLC oraz PLA_2 (powoduje to rozpad fosfolipidów błon komórkowych) i cyklooksxygenazę-2 (COX-2). Produkty peroksydacji lipidów również działają uszkadzająco. Dodatkowo Ca^{++} stymuluje dalszy wyrzut Glu z pęcherzyków presynaptycznych. Z kolei wychwyt zwrotny Glu (presynaptyczny i przez astrocyty) jest hamowany przez kwas arachidonowy i produkty peroksydacji lipidów (White i wsp., 2000). Wpływający do komórki Ca^{++} oddziałuje też na szlaki przekazywania wewnątrzkomórkowego zaangażowane w proces programowanej śmierci komórkowej. Między innymi aktywowana jest kinaza białkowa C (PKC) (ma to zwiększać wrażliwość na apoptozę) i kinazy MAP (ang. *Mitogen-Activated Protein*, w tym JNKs [ang. *c-Jun N-terminal Kinase*], p38, ERK1/2 [ang. *Extracellular signal-Regulated Kinase*]) – szczególnie podkreśla się udział p38 i ERKs w śmierci neuronów po niedokrwieniu, choć wyniki badań nie są jednoznaczne (Lee i wsp., 2000).

Tam więc gdzie nie dochodzi natychmiast do martwicy, ekscytotoksyczność może być inicjatorem zdarzeń prowadzących do apoptozy i zapalenia.

Oprócz Glu w trakcie niedokrwienia są uwalniane także inne neuroprzekaźniki – m.in. adenozyna, której stężenie, jako produktu rozpadu ATP, wzrasta gwałtownie. Ma ona działanie ochronne – zmniejsza (przez receptory A1) uwalnianie innych neurotransmitterów i pobudliwość błony komórkowej (von Lubitz, 1999).

W badaniach doświadczalnych podawanie antagonistów Glu zmniejsza obszar uszkodzenia, nie wpływając na wielkość przepływu mózgowego. Ponieważ wzrost Glu w obszarze penumbry jest przejściowy, sugeruje się, że ważniejsze dla poszerzania się zawału jest generowanie przez Glu fal depolaryzacji w obszarze okołozawałowym. Otwarcie kanałów wapniowych (zarówno tych zależnych od napięcia, jak i tych związanych z receptorami Glu) powoduje wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{++} . Skuteczność działania antagonistów receptorów glutaminergicznych może więc, częściowo przynajmniej, wynikać ze zmniejszenia liczby i amplitud fal depolaryzacji oraz dokońcowego napływu Ca^{++} (Gill i wsp., 1992). Także zablokowanie, farmakologiczne lub genetyczne, aktywności PLC i PLA_2 działa neuroprotektoryjnie (Lee i wsp., 2000).

Wydaje się ponadto, że istotne znaczenie w patofizjologii niedokrwienia mózgu odgrywa Zn^{++} . Pełni on ważne funkcje katalityczne i strukturalne związane z metaloproteinazami i czynnikami transkrypcyjnymi. Znaczna pula Zn^{++} jest zlokalizowana w pęcherzykach synaptycznych glutaminergicznych zakończeń nerwowych. Uwalniany pod wpływem depolaryzacji zależnej od Ca^{++} może on modulować czynność wielu receptorów i kanałów jonowych, choć dokładny mechanizm, który nasila efekt cytotoksyczności, pozostaje nieznany. Dokomorowe

podanie chelatora cynku – CaEDTA – zmniejsza uszkodzenie w modelu niedokrwienia globalnego (Lee i wsp., 2000; 2002).

Kwasica tkankowa

Brak dopływu tlenu wymusza glikolizę beztlenową i prowadzi do akumulacji mleczanów i kwasicy. Wiąże się z tym swoisty paradoks – zwiększone stężenie glukozy w tkance w czasie niedokrwienia nie tylko nie chroni przed uszkodzeniem, lecz wręcz je nasila, prawdopodobnie przez kwasicę mleczanową (Mergenthaler i wsp., 2004). Choć według niektórych badaczy, wlewy glukozy w badaniach eksperymentalnych zwiększały uszkodzenie raczej przez indukowane w ten sposób uwalnianie glikokortykosteroidów (Schurr, 2001).

Obniżenie pH w tkance działa uszkadzająco na wiele sposobów, m.in. przez generowanie wolnych rodników i hamowanie syntezy białek. Ponadto, chociaż blokuje receptory NMDA, to jednak równocześnie wzmacnia ekscytotoksyczność mediowaną przez receptory AMPA (Lee i wsp., 2000; Mergenthaler i wsp., 2004).

Depolaryzacja

Po raz pierwszy depolaryzację opisano w 1983 r. (Strong i wsp.), jako przejściowy wzrost stężenia K^+ na powierzchni opony miękkiej. Fale depolaryzacji występują spontanicznie i nieregularnie na obwodzie niedokrwienia, co wykazano w DWI, w modelu szczurzym (Hasegawa i wsp., 1995). W EEG stwierdza się lokalne wyciszenie aktywności korowej będące wynikiem masywnego wypływu K^+ z komórki – przez kanały potasowe, najpierw zależne od napięcia, a potem zależne od ATP. Prowadzi to do przejściowej hiperpolaryzacji błony komórkowej, a po kilku minutach następuje gwałtowna redystrybucja jonów związana z depolaryzacją błony (wypływ K^+ , napływ Na^+ , Cl^- , Ca^{++}) – tzw. depolaryzacja anoksemiczna. Powoduje ona wyrzut neurotransmitterów (szczególnie Glu) i dalsze rozchodzenie się fal depolaryzacyjnych (Lee i wsp., 2000). Równoczesny wzrost zużycia glukozy i ATP najpewniej wynika ze zwiększonej pracy pomp jonowych przywracających prawidłowy gradient jonowy po przejściu fali. Ponieważ jednak nie jest możliwe jednoczesne zwiększenie perfuzji, jak w normalnych warunkach, pojawiają się przejściowe epizody hipoksji (Back, 1998). Wykazano ponadto, że fale depolaryzacyjne same powodują skurcz naczyń, co dodatkowo zmniejsza regionalny przepływ krwi (Shin i wsp., 2005).

Ta nierównowaga pomiędzy perfuzją a zapotrzebowaniem na glukozę znalazła swe zastosowanie w neuroobrazowaniu niedokrwienia – pomiar CMRgl/CBF (ang. *Cerebral Metabolic Rate of glucose/Cerebral Blood Flow*) jest traktowany jako miara tego rozkojarzenia (ang. *uncoupling*) (Back i wsp., 1995).

Prawdopodobnie więc fale depolaryzacyjne, przynajmniej częściowo, odpowiadają za zwiększone zużycie glukozy w penumbry, a na pewno nasilają glikolizę beztlenową, zwiększając tym samym kwasicę mleczanową, oraz powodują spadek zawartości wysokoenergetycznych fosforanów. W badaniach doświadczalnych średnia częstość pojawiania się fal depolaryzacyjnych wynosi 4/godz. (zależy to m.in. od rozległości uszkodzenia), a utrzymywanie się fal obserwowano do 16 godz. od zamknięcia tętnicy (Saito i wsp., 1997). Wykazano też liniową zależność pomiędzy liczbą fal depolaryzacji a wielkością uszkodzenia. W przybliżeniu przejście każdej fali zwiększa obszar uszkodzenia o ok. 20% (Hossmann, 1994). Stąd próby farmakologicznego hamowania depolaryzacji, np. przez podawanie antagonistów receptorów glutaminergicznych. Z czasem dochodzi do terminalnej depolaryzacji charakterystycznej dla przebytego zawału. Depolaryzacja jest też prawdopodobnie odpowiedzialna za zahamowanie syntezy białek – poprzez aktywację genów odpowiedzi wczesnej, a następnie – kinaz białkowych (Back, 1998). Wykazano, że antagoniści receptorów glutaminergicznych m.in. obniżają próg zahamowania syntezy białek (Hossmann, 1994). Być może więc depolaryzacja jest zaangażowana w indukcję opóźnionej selektywnej śmierci neuronów.

Geny odpowiedzi wczesnej

Do genów odpowiedzi wczesnej należą protoonkogeny, m.in. z rodzin *c-fos* i *c-jun*, których białka tworzą heterodimery składające się na czynnik transkrypcyjny AP-1. W modelach szczurzych niedokrwienia mózgu zwiększoną ekspresję białek FOS i JUN obserwowano już po 30 min od reperfuzji – dotyczyło to komórek opornych na uszkodzenie. Do indukcji tych genów dochodzi nie tylko w obszarze niedokrwienia (włączając w to penumbry), lecz także w całej ipsilateralnej półkuli mózgu (Back, 1998). Pierwszym czynnikiem (a przynajmniej jednym z pierwszych) wyzwalającym ekspresję genów odpowiedzi wczesnej jest Glu. Być może ma to związek z rozchodzeniem się fal depolaryzacji, gdyż ekspresja genów odpowiedzi wczesnej może być wyindukowana przez korowe podanie KCl, a zablokowana przez antagonistów receptora NMDA (Weinstein i wsp., 2004). Rola tych genów w patofizjologii niedokrwienia mózgu jest niejedno-

znaczna. Z jednej strony, indukcja *c-fos* i *c-jun* pozostaje w ścisłym związku z syntezą innych białek stresowych – HSPs, będących białkami opiekuńczymi (do ich zadań należy m.in. ułatwianie prawidłowego fałdowania się białek) (White i wsp., 2000). Z drugiej zaś – indukcja tych genów prowadzi do aktywacji kinaz białkowych, co może w części odpowiadać za zahamowanie translacji, współodpowiedzialne za opóźnioną śmierć komórek. Przy czym, o ile indukcję transkrypcji genów odpowiedzi wczesnej stwierdzano w całym obszarze niedokrwienia, to tyle ich translację – tylko w pewnej odległości od ogniska zawału. Dowodzi to, że w otoczeniu *core* komórki są jeszcze przynajmniej jakiś czas żywe i zdolne zarówno do transkrypcji, jak i translacji genów. Uważa się, że ekspresja genów odpowiedzi wczesnej jest formą komórkowej próby zachowania homeostazy. W okresie późniejszym odgrywają one pewną rolę w plastyczności mózgu (Back, 1998).

W badaniach eksperymentalnych hamowanie syntezy *c-fos* zwiększało uszkodzenie spowodowane niedokrwieniem (Zhang i wsp., 1999).

Wolne rodniki

Badania z użyciem mikrodializy wykazały po niedokrwieniu znaczący wzrost stężenia rodnika hydroksylowego w obrębie penumbry. Stężenie to rośnie jeszcze po reperfuzji (Back, 1998), co oznacza, że reperfuzja sprzyja tworzeniu się wolnych rodników (WR). Stwierdzono też wzrost stężenia rodnika nadtlenkowego w korze po zamknięciu tętnicy środkowej mózgu (Peters i wsp., 1998). Prawdopodobnie istnieje interakcja pomiędzy ekscytotoksycznością i generowaniem WR – odnotowano m.in. współwystępowanie wysokich stężeń zewnątrzkomórkowego Glu i rodnika hydroksylowego w strefie okołozawałowej (Morimoto i wsp., 1996), a nie wykazano takiego związku czasowego dla depolaryzacji.

Na skutek aktywacji PLA_2 (przez wzrost wewnątrzkomórkowego Ca^{++}) i PLC (przez depolaryzację) rośnie stężenie wolnych kwasów tłuszczowych, w tym kwasu arachidonowego (AA). W czasie reperfuzji COX, dodając cząsteczkę tlenu do AA, powoduje utworzenie prostaglandyny (PG) G, której natychmiastowej peroksydacji towarzyszy uwalnianie rodnika $\cdot O_2$. Postępująca peroksydacja lipidów, poprzez rearanżację ich podwójnych wiązań, zmienia właściwości lipidów, co prowadzi m.in. do zmian w płynności i przepuszczalności błony komórkowej, negatywnie wpływając na funkcje receptorów, kanałów jonowych i innych białek błonowych, co – w konsekwencji – może spowodować śmierć komórki. W obecności jonów niektórych metali, np. żelaza, pe-

roksydacja może zachodzić w postępie geometrycznym. Bogatym źródłem tych jonów, magazynowanych głównie w postaci związanej z ferrytyną i transferryną, są komórki glejowe. W badaniach doświadczalnych obecność peroksydowanych lipidów obserwowano już po 15–30 min reperfuzji i utrzymywała się ona do 72 godz. Wiązało się to ze znacznym ubytkiem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i postępującym uszkodzeniem błony komórkowej. Chelatory żelaza (deferoksamina) znacznie zmniejszały nasilenie tych zmian (White i wsp., 1988).

WR oddziałują także z pozostałymi składnikami komórkowymi: węglowodanami, aminokwasami, DNA, przyczyniając się do ich uszkodzenia. Na przykład, powodując pęknięcia pojedynczych nici DNA, prowadzą do aktywacji enzymu naprawiającego PARP-1 (ang. *Poly[ADP-Ribose] Polymerase-1*), a w konsekwencji – wyczerpywania się komórkowych zapasów NAD^+ i energii (Szabo, Dawson, 1998). Ponadto hipoksja wraz z dużym wewnątrzkomórkowym stężeniem Ca^{++} i WR uszkadza mitochondria. Prowadzi to m.in. do utworzenia tzw. mitochondrialnych porów przejściowej przepuszczalności (MPT, ang. *Mitochondrial Permeability Transition pore*). To z kolei powoduje, w połączeniu z utratą potencjału elektrochemicznego mitochondriów, że organelle te brzękną, uwalniają WR i cząsteczki o działaniu proapoptotycznym (cytochrom c), co inicjuje tworzenie apoptosomu i apoptozę (Mergenthaler i wsp., 2004).

Zewnętrznym źródłem WR są m.in. komórki nacieku zapalnego i aktywowany mikroglej. Zresztą same WR działają chemotaktycznie na komórki zapalne. W badaniach eksperymentalnych wykazano skuteczność w zmniejszaniu uszkodzenia przez podawanie zmiataczy WR. Również u transgenicznym myszy z wyższym poziomem ekspresji CuZnSOD rozmiary zawału były znacznie mniejsze (Back, 1998).

WR powodują też aktywację czynników transkrypcyjnych (m.in. NF- κ B i AP-1). Prowadzi to m.in. do indukcji ekspresji metaloproteinaz macierzy (MMP, ang. *Matrix Metalloproteinases*) (zob. rozdział 8 „Genetyczne aspekty udaru mózgu”) (Liu, Rosenberg, 2005).

Uszkodzające działanie WR w niedokrwieniu mózgu wynika także z ich wpływu na naczynia. Z jednej strony WR (szczególnie rodnik hydroksylowy) działają wazodylatacyjnie, z drugiej jednak wykazano, że powodują nieprawidłową odpowiedź naczyń na substancje naczyniorozszerzające zależne od śródbłónka. Na przykład, acetylocholina w obecności WR paradoksalnie działa wazokonstrykcyjnie. Do tego WR powodują lokalne uszkodzenie komórek śródbłónka oraz wzrost przepuszczalności śródbłónka i bariery krew–mózg – najpewniej na skutek uszkodzenia cytoszkieletu (Kontos, 2001).

Zapalenie

Jak widać, powstawanie zawału jest procesem rozciągniętym w czasie. Za narastanie uszkodzenia jest odpowiedzialne m.in. zapalenie.

WR, NO, Ca^{++} i inne cząsteczki indukowane przez niedotlenienie mogą wyzwać proces zapalny, który rozwija się już w pierwszych godzinach po niedokrwieniu. Odpowiednie czynniki transkrypcyjne są indukowane w astrocytach, mikrogleju, komórkach śródbłónka, leukocytach, prowadząc do zwiększonej ekspresji cytokin i chemokin. Do istotnych dla zapalenia czynników transkrypcyjnych należą m.in.: NF- κ B (ang. *Nuclear Factor- κ B*, aktywuje: TNF- α [ang. *Tumor Necrosis Factor- α*], interleukinę [IL] 1 α , IL-1 β , IL-6), HIF-1 (indukuje VEGF – m.in. zwiększa przepuszczalność bariery krew–mózg), IRF-1 (indukuje interferon- γ stymulujący makrofagi). Istotną rolę pełnią też przekazy, takie jak np.: STAT-1,-3 (ang. *Signal Transducer and Activator of Transcription*), indukujące produkcję PAF (ang. *Platelet-Activating Factor*), MCP-1 (ang. *Monocyte Chemoattractant Protein*), ICAM-1 (ang. *Intercellular Adhesion Protein*). Także PGE_2 produkowana *via* COX może nasilać reakcję zapalną, indukując TNF- α , IL-6 (Slevin i wsp., 2005). W późniejszym okresie indukowane są też cytokiny o działaniu antyzapalnym – np. TGF- β 1 (ang. *Transforming Growth Factor- β 1*), IL-10 (Mergenthaler i wsp., 2004). Cytokiny prozapalne mogą również uruchamiać szlak zewnętrzny apoptozy (patrz niżej) przez receptory związane z domeną śmierci (TNF- α i TNF-R1, FasL i Fas), a także szlak kinaz MAP, z których JNK i p38 wiążą się z procesem programowanej śmierci komórkowej, której czas (godziny – dni po niedokrwieniu) i miejsce (penumbra) są podobne jak w przypadku reakcji zapalnej (Mergenthaler i wsp., 2004; Slevin i wsp., 2005).

Rosnąca ekspresja cząsteczek adhezyjnych na powierzchni śródbłónka (ICAM-1, selektyna E, PECAM-1 [ang. *Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule*]) i leukocytach (CD11b/CD18, CD11a/CD18) nasila migrację tych ostatnich w obręb uszkodzonej tkanki, a w późniejszym okresie również monocytów/makrofagów. Indukcja ICAM-1, selektyny E oraz CINC (ang. *Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant*) jest wykrywalna już po 3–6 godz. od niedokrwienia. W *core* stwierdzono także ekspresję integryny $\alpha\beta$ 3 będącej prawdopodobnie markerem odpowiedzi naczyniowej oraz MIP-1 (ang. *Macrophage Inflammatory Protein*) – w obszarach obecności monocytów/makrofagów (*core* i strefa przyległa) (Mergenthaler i wsp., 2004).

Nagromadzenie komórek nacieku zapalnego w penumbrze upośledza funkcje mikrokrążenia. Po 24 godz. od zamknięcia tętnicy środkowej mózgu w obszarze okołozawałowym naciek zapalny jest już wyraźny. Me-

chanizmów powiększania uszkodzenia związanych z leukocytami jest kilka: mechaniczne blokowanie kapilar, uwalnianie WR, NO, substancji wazokonstrykcyjnych (Back, 1998). Ponadto aktywowane granulocyty, monocyty/makrofagi, limfocyty (ale i mikroglej, astrocyty i neurony) produkują i uwalniają cytokiny i chemokiny. Z prozapalnych cząsteczek największą rolę w ewolucji zawału przypisuje się IL-1 β i TNF- α . W modelach eksperymentalnych ich wyłączenie różnymi metodami miało działanie ochronne (Del Zoppo i wsp., 2000). Także indukcja neutropenii bądź podawanie przeciwciał skierowanych przeciwko cząsteczkom adhezyjnym (anty-CD18, -CD11b, -ICAM-1) zmniejszały akumulację leukocytów i rozmiary doświadczalnych zawałów (Back, 1998), choć w badaniach klinicznych zastosowanie przeciwciał anty-ICAM-1 nie przyniosło korzyści.

Istotną rolę w zapaleniu pełnią również komórki mikrogleju, będące pierwotnymi efektorami immunologicznymi w OUN. Ich aktywacja jest szczególnie widoczna w obszarze penumbry. Mają one zdolność produkcji licznych cytokin i substancji o działaniu cytotoksycznym (WR), enzymów degradujących (np. katepsyna) oraz właściwości żerne. Hamowanie aktywacji mikrogleju w modelach doświadczalnych (tetracyklina, minocyklina) skutkowało zmniejszeniem uszkodzenia w modelu ogniskowego niedokrwienia. Ponieważ jednak mikroglej może też produkować substancje o działaniu protekcyjnym (np. czynniki wzrostu), trudno jest jednoznacznie ocenić jego rolę w udarze (Mergenthaler i wsp., 2004).

Nieco mniejsze znaczenie w reakcji zapalnej po niedokrwieniu przypisuje się astrocytom, które również mają zdolność produkcji nie tylko cytokin prozapalnych, lecz także substancji o neuroprotekcyjnym działaniu, jak erythropoetyna, TGF- β 1, czy metalotioneina-2.

Oprócz cytokin i cząsteczek adhezyjnych istotną rolę w zapaleniu pełnią niektóre enzymy i produkty ich działania, takie jak indukowalna syntaza NO (iNOS) czy COX-2. W porównaniu z enzymami konstytutywnymi (eNOS i nNOS) iNOS (indukcja stwierdzana już po 12 godz.) produkuje więcej NO działającego cytotoksycznie poprzez tworzenie rodnika ONOO $^-$. Zahamowanie syntezy NO przez podanie aminoguanidyny (selektywny inhibitor iNOS) czy L-NA (N $^{\omega}$ -nitro-L-arginina, nieselektywny inhibitor NOS) zmniejszało rozmiary eksperymentalnych zawałów (Gürsoy-Özdemir i wsp., 2000; Iadecola, Alexander, 2001). Ekspresja COX-2 dominuje w penumbry, gdzie enzym działa uszkadzająco poprzez produkcję prostanoidów i WR. Wyłączenie działania COX-2 farmakologicznie bądź przez manipulacje genetyczne działa neuroprotekcyjnie. W badaniach na szczurach rezultat ochronny był widoczny, nawet jeśli enzymy te były blokowane po upływie 6–24 godz. od początku niedokrwienia (Iadecola, Alexander, 2001; Mergenthaler i wsp., 2004).

Jedną z przyczyn niepowodzeń dotychczasowych prób neuroprotekcji za pomocą hamowania reakcji zapalnej może być likwidacja pojawiających się w późniejszym okresie pozytywnych skutków zapalenia – udziału w przebudowie (ang. *remodeling*) i naprawie tkanki. Sugeruje się, że blokując komórki zapalne, usuwa się jednocześnie źródło czynników troficznych i wspomagających rewaskularyzację. Wiadomo na przykład, że neurony i astrocyty mogą wydzielać czynniki troficzne, takie jak NGF czy BDNF, a przez aktywację kinaz PI3K i PKB hamować proapoptotyczne białka p53 i Bad, przez szlak PLC-PKC zaś aktywować prożyciowe szlaki *via* NF- κ B i Bcl-2. Ponieważ wzajemne powiązania poszczególnych szlaków przekazywania są bardzo złożone, nie wydaje się, by proste zahamowanie jednej tylko składowej reakcji zapalnej mogło przynieść znaczący skutek terapeutyczny (Wang, Feuerstein, 2004; Slevin i wsp., 2005).

Uszkodzenie bariery krew–mózg

Zachowanie integralności bariery krew–mózg jest możliwe dzięki złożonym interakcjom pomiędzy komórkami śródbłonna, astrocytami i macierzą zewnątrzkomórkową. Niedokrwienie prowadzi do uszkodzenia bariery. Wzrost jej przepuszczalności jest dwufazowy: pierwszy raz – zaraz po rozpoczęciu reperfuzji, drugi (znacznie większy) – 1–2 dni później (Kuroiwa i wsp., 1985). Istotną rolę w uszkodzeniu bariery krew–mózg odgrywają metaloproteiny macierzy (MMPs). Są one m.in. odpowiedzialne za degradację kolagenu typu IV, lamininy, fibronektyny – głównych składników błony podstawnej naczyń mózgowych. To ułatwia migrację komórek nacieku zapalnego i prowadzi do rozwoju obrzęku naczyńiopochodnego. Indukcję ekspresji MMP-2 i -9 stwierdzano już 1–3 godz. po niedokrwieniu. Również neutrofile mogą uwalniać MMP-9 w czasie reakcji zapalnej. Aktywacja MMP-9 koreluje m.in. z uszkodzeniem bariery krew–mózg i ukrwotoczeniem zawału. U chorych z udarem niedokrwionym stwierdzono większe stężenie MMP-9 w grupie osób z ukrwotoczonym zawałem i większym deficytem neurologicznym (Cunningham i wsp., 2005). Zablockowanie funkcji MMPs, genetyczne bądź farmakologiczne, zmniejsza i obrzęk, i rozmiary zawału (Cunningham i wsp., 2005; Heo i wsp., 2005). Z MMPs w uszkodzaniu bariery prawdopodobnie współdziała tkankowy aktywator plazminogenu (tPA, ang. *tissue Plasminogen Activator*). Ma on zdolność m.in. degradacji składników błony podstawnej. Jest to o tyle istotne, że rekombinowany tPA jest stosowany w leczeniu udaru niedokrwinnego mózgu. Jednak przy jego odpowiednio wczesnym zastosowaniu korzyści wynikające z przywrócenia perfuzji mózgowej

przewyższając potencjalne negatywne wpływy tPA (Heo i wsp., 2005).

Istotną rolę w regulacji przepuszczalności bariery krew-mózg i powstawaniu obrzęku odgrywają także akwaporyny (AQP). Są to małe białka błonowe, pełniące funkcję kanałów specyficznych dla wody. Dobrze udokumentowany wydaje się udział AQP4 w powstawaniu obrzęku mózgu po niedokrwieniu. Wykazano wzrost jej ekspresji na poziomie mRNA i białka w badaniach doświadczalnych, u myszy zaś pozbawionych AQP4 obserwowano mniejszy obrzęk, mniejsze rozmiary zawału, a nawet mniejszy deficyt neurologiczny. Nieco mniej wiadomo na temat roli AQP9, ale i w jej przypadku stwierdzono indukcję ekspresji w astrocytach otaczających ognisko zawału (Heo i wsp., 2005).

VEGF (naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonna, ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*), oprócz silnego działania proangiogenne, zwiększa – w sposób znaczący – przepuszczalność naczyń krwionośnych, co również ma duże znaczenie w uszkodzeniu bariery krew-mózg i powstawaniu obrzęku mózgu po niedokrwieniu (Heo i wsp., 2005).

W późniejszym okresie niedokrwienia do uszkodzenia bariery krew-mózg przyczyniają się też komórki nacieku zapalnego, uwalniające m.in.: WR, MMPs i inne enzymy proteolityczne.

Śmierć komórek: martwica, programowana śmierć komórkowa

Niezależnie od użytego modelu eksperymentalnego – trwałego czy przejściowego niedokrwienia – w obszarze *core* dochodzi do masowej śmierci komórek (wszystkich rodzajów, tj. neuronów, gleju, komórek naczyń) w mechanizmie martwicy. Ten rodzaj śmierci uważany jest za bierny, wynikający z nagłej niewydolności energetycznej komórki, prowadzącej m.in. do zaburzeń czynności pomp jonowych, ostrego obrzęku komórki, przerwania ciągłości błony komórkowej i organelli, rozpadu komórki.

W przeciwieństwie do martwicy, apoptoza jest czynnym sposobem umierania, wymagającym nakładów energetycznych i kontrolowanym genetycznie. W ten sposób umierają np. neurony w czasie ontogenezy. Na zakończenie procesu śmierci programowanej (PCD, ang. *Programmed Cell Death*) komórki stają się ciałkami apoptotycznymi fagocytowanymi przez komórki żerne, ale bez indukcji reakcji zapalnej – odwrotnie niż w martwicy, w której reakcja zapalna jest wyraźna.

PCD jest złożonym zjawiskiem, którego dokładny opis przekracza ramy niniejszego opracowania. Uznaje się istnienie dwóch szlaków aktywacji apoptozy zależnych od

kaspaz: zewnętrznego i wewnętrznego oraz niezależnego od kaspaz *via* AIF (ang. *Apoptosis-Inducing Factor*, uwalniany z mitochondriów). W szlaku zewnętrznym uczestniczą receptory zawierające tzw. domenę śmierci (ang. *death domain*), m.in. Fas i TNF-R1 należące do nadrodziny receptorów TNF. Aktywacja tego szlaku prowadzi do uczynienia kaspazy-8, a następnie kaspazy-3. Natomiast uruchomienie szlaku wewnętrznego (w niedokrwieniu m.in. poprzez wzrost Ca^{++} wewnątrzkomórkowego, WR, Glu, uszkodzenie DNA) rozpoczyna translokacja białka Bax do błony mitochondrialnej, uwolnienie z mitochondrium do cytoplazmy cytochromu c, tworzącego wraz z Apaf-1 (ang. *Apoptosis protease-activating factor-1*) apoptosom, aktywację kaspazy-9, a potem kaspazy-3 (Ferrer, Planas, 2003).

Kaspazy (ang. *cysteiny-l-aspartic acid protease*) są proteazami cysteinowymi konstytutywnie produkowanymi w postaci zymogenów. Po aktywacji tną one substraty (również prokaspazy) w pobliżu reszty kwasu asparaginowego. Ogólnie wyróżnia się kaspazy inicjatorowe (kaspaza-8, -9, -10), które mogą m.in. aktywować inne kaspazy, oraz kaspazy efektorowe (kaspaza-3, -6, -7), które głównie tną składowe komórki. Niektóre spośród kaspaz (kaspaza-1, -2, -4, -5, -11, -12) mogą działać zarówno inicjująco, jak i wykonawczo (Graham, Chen, 2001).

Substratami kaspaz są liczne życiowo ważne białka, w tym PARP-1 – enzym, którego zadaniem jest naprawa uszkodzonej nici DNA. W przypadku niedokrwienia aktywacja PARP-1 uczestniczy jednak w promowaniu śmierci komórkowej, m.in. przez zużycie NAD^{+} i ATP. Proteolizie zależnej od kaspaz ulegają też: DNA-PK (ang. *DNA Protein Kinase*), lamina B, gelsolina, β -aktyna (po cięciu traci zdolność do polimeryzacji i hamowania aktywności DNazy I), fodryna, ICAD (ang. *Inhibitor of Caspase-Dependent DNase*). W rezultacie pojawiają się zmiany charakterystyczne dla programowanej śmierci komórkowej: zablokowanie naprawy DNA, kondensacja chromatyny, internukleosomalna fragmentacja DNA. Aktywowane są też inne proteazy, jak np. kalpainy, katepsyna D, proteasom 20S (Rami, 2003).

Precyzyjna regulacja PCD obejmuje białka hamujące apoptozę – głównie z rodziny IAP (ang. *Inhibitor of Apoptosis*). Należący do niej XIAP (ang. *X-linked Inhibitor of Apoptosis*) blokuje kaskadę kaspaz, podlegając jednocześnie negatywnej kontroli ze strony Smac/DIABLO (ang. *Second mitochondrial activator of caspases/Direct IAP Binding Protein with Low pI*) (Ferrer, Planas, 2003).

Wśród organelli szczególną pozycję w programowanej śmierci komórkowej zajmują mitochondria. Tu aktywowany jest szlak wewnętrzny apoptozy, uwalniany jest AIF, a ponadto uszkodzone mitochondria nie są w stanie zapewnić prawidłowego gradientu elektrochemicznego, tak ważnego dla utylizacji glukozy i oddychania komórkowego. Są one także źródłem WR uszkadzających inne organelle i DNA (Graham, Chen, 2001).

Jak dotąd nie określono jednoznacznie, w jaki sposób umierają neurony na zewnątrz *core*. W badaniach z użyciem metody TUNEL (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling*, pozwala na detekcję pęknięć nici DNA) czy elektroforezy DNA stwierdzano fragmentację DNA w komórkach na obrzeżach zawału we wczesnym okresie po niedokrwieniu. Ma to przemawiać za obecnością apoptozy w obrębie penumbry. Podobne wyniki uzyskiwano jednak też dla *core*. Według niektórych badaczy, tak naprawdę obie te metody pokazują raczej tylko obecność pęknięć w DNA jądrowym (MacManus i wsp., 1999). Jak dotąd, ani w modelach doświadczalnych, ani w badaniach na materiale ludzkim, nie stwierdzono w obszarze zawału zmian ultrastrukturalnych charakterystycznych dla apoptozy (tj. wczesnej kondensacji chromatyny, zbitego jądra, ciałek apoptotycznych) (Ferrer, Planas, 2003; Graham, Chen, 2001). Ponadto sposób fragmentacji DNA widoczny w elektroforezie jest – według niektórych autorów – inny niż w klasycznej PCD (Ferrer, Planas, 2003). Niemniej uważa się, że w penumbry jest obecna jakaś forma PCD. W obszarze penumbry stwierdzono bowiem aktywację białek kluczowych dla procesu apoptozy (m.in. rodzina białek Bcl-2, kaspazy) (Graham, Chen, 2001).

Wydaje się, że względny udział martwicy i PCD zależy od natężenia niedokrwienia. Na przykład, do uruchomienia kaskady kaspaz konieczna jest energia w postaci ATP. To, czy ostatecznie dojdzie do martwicy czy apoptozy, wydaje się zależeć m.in. od siły sygnału śmierci, ekspresji cząsteczek zaangażowanych w proces umierania i równowagi pomiędzy sygnałami dla jednego lub drugiego rodzaju śmierci. Stąd w modelach ogniskowych w *core* dominuje martwica, w penumbry zaś możliwa jest inicjacja PCD. Przy czym jeżeli np. dojdzie do spadku stężenia glukozy i zahamowania syntezy białek, również w penumbry dochodzi do martwicy. Prawdopodobnie więc obszar selektywnej śmierci neuronów z czasem, przy utrzymującym się niedokrwieniu, może się przekształcić w zawał. W przypadku modeli globalnego niedokrwienia stwierdzono np., że komórki z pola CA1 hipokampa obumierające po kilku dniach, z jednej strony wykazują cechy charakterystyczne dla martwicy (dezagregację polierybosomów, proliferację aparatu Golgiego i siateczki endoplazmatycznej z późniejszym obrzękiem i rozpadem komórek), a z drugiej – obserwowano fragmentację DNA charakterystyczną dla PCD (Graham, Chen, 2001).

Jak podkreśla wielu badaczy, w przypadku niedokrwienia mamy prawdopodobnie do czynienia z pewnego rodzaju continuum, którego skrajnościami są PCD i martwica.

W obszarze niedokrwienia wykazano zmiany ekspresji białek z rodziny Bcl-2, m.in. proapoptotyczny Bax jest indukowany głównie w *core* i w bezpośrednim otoczeniu, podobnie jak cięta kaspaza-3, natomiast

prożyciowe Bcl-2 i Bcl-xl – raczej w penumbry, w komórkach, które przeżywają. Badania eksperymentalne wykazały, że zwiększona ekspresja Bcl-2 u myszy transgenicznnych wiąże się ze zmniejszeniem rozmiarów zawału. Ogólnie rzecz biorąc, geny związane z uszkodzeniem DNA (*GADD45*, *p53*, *Bax*, *MDM2*) są indukowane raczej w *core* i w jego bezpośrednim otoczeniu; z kolei geny związane z naprawą – w obszarze przyległym do zawału, natomiast w *core* ich ekspresja spada (Sharp i wsp., 2000; Ferrer, Planas, 2003).

Udział receptorów z domeną śmierci w patofizjologii niedokrwienia mózgu wydaje się bezsprzeczny – wykazano wzrost ekspresji Fas po niedokrwieniu, a jego liganda (FasL) w obrębie penumbry. Myszy transgeniczne z nieczynnym funkcjonalnie genem *fas* lub *fasl* mają mniejsze uszkodzenie (Martin-Villalba i wsp., 2001; Graham i wsp., 2004).

Wydaje się, że dość mocne dowody przemawiają za udziałem szlaków zależnych od kaspaz w śmierci komórkowej w penumbry po niedokrwieniu przejściowym. Wzrost ekspresji kaspazy-1, -3, -8, -9 został wykazany w penumbry. Obserwowano też uwalnianie cytochromu c do cytoplazmy w czasie podobnym do translokacji Bax i aktywacji kaspazy-9. Dokomorowe podawanie inhibitorów kaspazy-3 (np. z-DEVD.FMK) zmniejszało rozmiary uszkodzenia w badaniach eksperymentalnych (Schulz i wsp., 1999). Z kolei w modelu trwałego zamknięcia tętnicy środkowej mózgu blokowanie kaspaz nie wpływało znamienne na wielkość zawału, co może sugerować, że w tym modelu dominuje martwica (Li i wsp., 2000).

Są też dane przemawiające za aktywnym hamowaniem w obszarze penumbry sygnałów prożyciowych – wykazano m.in. trawienie XIAP i uwalnianie Smac/DIABLO do cytoplazmy (Ferrer, Planas, 2003).

Hamowanie translacji

Już na początku lat siedemdziesiątych XX wieku stwierdzono, że w komórkach piramidowych z pola CA1 hipokampa w modelach globalnego niedokrwienia mózgu, po reperfuzji, nie ma wznowienia translacji w tych komórkach, które potem umierają. Zahamowanie syntezy białek jest jednym z pierwszych zjawisk molekularnych po niedokrwieniu, do którego dochodzi już przy zmniejszeniu przepływu krwi o ok. 50% i nie wynika to ze zmniejszenia zapasów ATP (następuje ono dopiero przy spadku do ok. 20% wartości prawidłowych perfuzji) (Sharp i wsp., 2000). Mechanizmy hamowania translacji nie zostały jeszcze do końca poznane. Wydaje się, że nie odgrywają tu znaczącej roli takie czynniki, jak: zachowanie integralności DNA, aparat transkrypcyjny, obróbka

i transport mRNA, sprawność rybosomów. Stężenie aminokwasów także znacząco nie spada (White i wsp., 2000).

Przyjmuje się hipotezę, że zahamowanie syntezy białek jest wynikiem hamowania inicjacji translacji we wczesnej fazie reperfuzji. Po niedokrwieniu zaobserwowano m.in. znaczącą proteolizę eIF4G (czynnik inicjujący translację, ang. *eukaryotic translation Initiation Factor*), w której uczestniczy κ -kalpain, oraz ok. 20-krotny wzrost fosforylacji eIF2 α . Przy czym fosforylacja eIF2 α mediowana przez PERK (ang. *Protein kinase-like ER eIF2 α Kinase*) jest przejściowa i wydaje się, że raczej defosforylacja tego czynnika w późniejszym okresie (2–4 godz. po reperfuzji), w której uczestniczy GADD34 (podjednostka regulatorowa kompleksu fosfatazy defosforylującej eIF2 α indukowana przez stres), odgrywa istotną rolę w hamowaniu syntezy białek. Oprócz wspomnianego spadku stężenia eIF4G spada też zawartość eIF4E w czasie niedokrwienia – oba czynniki są prawdopodobnie degradowane przy udziale kalpain, ale nie kaspazy-3. Ponadto w trakcie reperfuzji, w ciągu pierwszych 24 godz., defosforylacji ulega kinaza S6 (jej hiperfosforylowana postać stymuluje translację mRNA kodujących białka rybosomalne i czynników elongacyjnych), a w okresie późniejszym zmniejsza się także stężenie tego enzymu (DeGracia, 2004).

Nieodwracalność zahamowania syntezy białek oznacza letalne uszkodzenie komórki. W obrębie *core* nie stwierdza się syntezy nowych białek w neuronach i astrocytach. Natomiast w tych komórkach, które przeżyją, synteza białek jest kontynuowana. Na przykład, stwierdzono ekspresję HSPs, iNOS, eNOS, cytokin, chemokin oraz cząsteczek adhezyjnych w naczyniach w strefie zawału i jego obrzeżach (Sharp i wsp., 2000).

Rewaskularyzacja/angiogeneza

W badaniach eksperymentalnych, ale też i na materiale ludzkim, wykazano, że po przebytych zawale mózgu w tkance przyległej do zawału zachodzi wzmocniona angiogeneza. Wydaje się, że tworzenie nowych naczyń następuje przez pączkowanie i łączenie się z istniejącą siecią mikrokrążenia. Proces ten rozpoczyna się już w pierwszym tygodniu po przebytych niedokrwieniu i przebiega w sposób podobny jak w rozwijającym się mózgu. Powstające nowe kapilary tworzą krążenie oboczne zaopatrujące obrzeża zawału. Niestymulowana farmakologicznie angiogeneza daje się stwierdzić 3–4 dni po zawale, czyli w czasie znacznie wykraczającym poza okno terapeutyczne związane z możliwością odwrócenia procesów zachodzących w penumbry. Jest to bardzo

skomplikowany proces regulowany przez wiele różnych czynników. Niektóre z nich jednocześnie mogą stymulować angiogenezę i działać proapoptotycznie na neurony (p38, JNK) (Slevin i wsp., 2005). Prawdopodobnie istotną rolę regulacyjną pełni apoptoza komórek śródbłónki naczyniowej – w modelu niedokrwienia ogniskowego fazę angiogenezy poprzedzał przejściowy okres apoptozy komórek śródbłónki (Beck i wsp., 2000).

Istotnym źródłem czynników proangiogennych są komórki nacieku zapalnego (leukocyty, monocyty/makrofagi) oraz uszkodzone płytki krwi. Także cytokiny prozapalne IL-1 β i TNF- α mają m.in. zdolność indukcji angiopoetyny-1 działającej prożyciowo na komórki śródbłónki (via PI3K oraz Akt), pośredniczącej w migracji komórek, zmniejszającej przepuszczalność naczyń krwionośnych i rozmiary zawału w modelach doświadczalnych niedokrwienia mózgu (Beck i wsp., 2000; Slevin i wsp., 2005).

Jednym z najsilniej działających czynników angiogennych jest VEGF, który jednak na początku niedokrwienia działa raczej uszkodzająco poprzez zwiększanie przepuszczalności naczyń i bariery krew–mózg, a w konsekwencji – nasilenie obrzęku. Z drugiej jednak strony wykazano, że w modelu ogniskowego niedokrwienia u szczura VEGF wzmacnia działanie neuroprotektoryjne, a także neurogenezę i angiogenezę (Slevin i wsp., 2005; Sun, Guo, 2005).

W obszarze okołozawałowym, z obecną angiogenezą, stwierdzono zwiększoną ekspresję licznych czynników proangiogennych: VEGF, PDGF, TGF- β , FGF-2, angiopoetyny-1, -2 (Beck i wsp., 2000; Slevin i wsp., 2005).

Piśmiennictwo

- Astrup J., Siesjö B.K., Symon L. (1981), *Thresholds in cerebral ischemia – the ischemic penumbra*. Stroke, 12, 723–725.
- Back T., Zhao W., Ginsberg M.D. (1995), *Three-dimensional image analysis of brain glucose metabolism-blood flow uncoupling and its electrophysiological correlates in the acute ischemic penumbra following middle cerebral artery occlusion*. J. Cereb. Blood Flow Metab., 15, 566–577.
- Back T. (1998), *Pathophysiology of the ischemic penumbra – revision a concept*. Cell Mol. Neurobiol, 18, 621–638.
- Beck H., Acker T., Wiessner C., Allegrini P.R., Plate K.H. (2000), *Expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and tie receptors after middle cerebral artery occlusion in the rat*. Am. J. Pathol., 157, 1473–1483.
- Cunningham L.A., Wetzel M., Rosenberg G.A. (2005), *Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia*. Glia, 50, 329–339.
- DeGracia D.J. (2004), *Acute and persistent protein synthesis inhibition following cerebral reperfusion*. J. Neurosci. Res., 77, 771–776.

- Del Zoppo G., Ginis I., Hallenbeck J.M., Iadecola C., Wang X., Feuerstein G.Z. (2000), *Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia*. Brain Pathology, 10, 95–112.
- Ferrer I., Planas A.M. (2003), *Signaling of cell death and survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra*. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 62, 329–339.
- Gill R., Andine P., Hillered L., Persson L., Hagberg H. (1992), *The effect of MK-801 on cortical spreading depression in the penumbral zone following focal ischaemia in the rat*. J. Cereb. Blood Flow Metab., 12, 371–379.
- Graham E.M., Sheldon R.A., Flock D.L., Ferriero D.M., Martin L.J., O'Riordan D.P., Northington F.J. (2004), *Neonatal mice lacking functional Fas death receptors are resistant to hypoxic-ischemic brain injury*. Neurobiol. Dis., 17, 89–98.
- Graham S.H., Chen J. (2001), *Programmed cell death in cerebral ischemia*. J. Cereb. Blood Flow Metab., 21, 99–109.
- Gürsoy-Özdemir Y., Bolay H., Saribas O., Dalkara T. (2000), *Role of endothelial nitric oxide generation and peroxynitrite formation in reperfusion injury after focal cerebral ischemia*. Stroke, 31, 1974–1981.
- Hasegawa Y., Latour L.L., Formato J.E., Sotak C.H., Fisher M. (1995), *Spreading waves of a reduced diffusion coefficient of water in normal and ischemic rat brain*. J. Cereb. Blood Flow Metab., 15, 179–187.
- Heiss W.D., Huber M., Fink G.R., Herholz K., Pietrzyk U., Wagner R., Wienhard K. (1992), *Progressive derangement of periinfarct viable tissue in ischemic stroke*. J. Cereb. Blood Flow Metab., 12, 193–203.
- Heiss W.D., Kracht L.W., Thiel A., Grond M., Pawlik G. (2001), *Penumbra probability thresholds of cortical flumazenil binding and blood flow predicting tissue outcome in patients with cerebral ischemia*. Brain, 124, 20–29.
- Heo J.H., Han S.W., Lee S.K. (2005), *Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke*. Free Radical Biol. Med., 39, 51–70.
- Hossmann K.-A. (1994), *Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia*. Ann. Neurol., 36, 557–565.
- Iadecola C., Alexander M. (2001), *Cerebral ischemia and inflammation*. Curr. Opin. Neurol., 14, 89–94.
- Kontos H.A. (2001), *Oxygen radicals in cerebral ischemia. The 2001 Willis lecture*. Stroke, 32, 2712–2716.
- Krause G.S., White B.C., Aust S.D., Nayini N.R., Kumar K. (1988), *Brain cell death following ischemia and reperfusion: a proposed biochemical sequence*. Crit. Care Med., 16, 714–726.
- Kuroiwa T., Ting P., Martinez H., Klatzo I. (1985), *The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion*. Acta Neuropathol. (Berlin), 68, 122–129.
- Lee J.M., Grabb M.C., Zipfel G.J., Choi D.W. (2000), *Brain tissue responses to ischemia*. J. Clin. Invest., 106, 723–731.
- Lee J.M., Zipfel G.J., Park K.H., He Y.Y., Hsu C.Y., Choi D.W. (2002), *Zinc translocation accelerates infarction after mild transient focal ischemia*. Neuroscience, 115, 871–878.
- Li H., Colbourne F., Sun P., Zhao Z., Buchan A.M., Iadecola C. (2000), *Caspase inhibitors reduce neuronal injury after focal but not global cerebral ischemia in rats*. Stroke, 31, 176–182.
- Liu K., Rosenberg G.A. (2005), *Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia*. Free Radical Biol. Med., 39, 71–80.
- MacManus J.P., Fliss H., Preston E., Rasquinha I., Tuor U. (1999), *Cerebral ischemia produces ladder DNA fragments distinct from cardiac ischemia and archetypal apoptosis*. J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 502–510.
- Martin-Villalba A., Hahne M., Kleber S., Vogel J., Falk W., Schenkel J., Krammer P.H. (2001), *Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke*. Cell Death Differ., 8, 679–686.
- Mergenthaler P., Dirnagl U., Meisel A. (2004), *Pathophysiology of stroke: lessons from animal models*. Metab. Brain Dis., 19, 151–167.
- Morimoto T., Globus M.Y., Busto R., Martinez E., Ginsberg M.D. (1996), *Simultaneous measurement of salicylate hydroxylation and glutamate release in the penumbral cortex following transient middle cerebral artery occlusion in rats*. J. Cereb. Blood Flow Metab., 16, 92–99.
- Peters O., Back T., Lindauer U., Busch C., Megow D., Dreier J., Dirnagl U. (1998), *Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat*. J. Cereb. Blood Flow Metab., 18, 196–205.
- Rami A. (2003), *Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: the calpain-calpastatin-caspase hypothesis*. Neurobiol. Dis., 13, 75–88.
- Saito R., Graf R., Hubel K., Fujita T., Rosner G., Heiss W.D. (1997), *Reduction of infarct volume by halothane: effect on cerebral blood flow or perifocal spreading depression-like depolarizations*. J. Cereb. Blood Flow Metab., 17, 857–864.
- Schulz J.B., Weller M., Moskowitz M.A. (1999), *Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases*. Ann. Neurol., 45, 421–429.
- Schurr A. (2001), *Glucose and the ischemic brain: a sour grape or a sweet treat?* Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, 4, 287–292.
- Sharp F.R., Lu A., Tang Y., Millhorn D.E. (2000), *Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia*. J. Cereb. Blood Flow Metab., 20, 1011–1032.
- Shin H.K., Dunn A.K., Jones P.B., Boas D.A., Moskowitz M.A., Ayata C. (2005), *Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations*. J. Cereb. Blood Flow Metab., 25, 1–13.
- Slevin M., Krupinski J., Kumar P., Gaffney J., Kumar S. (2005), *Gene activation and protein expression following ischaemic stroke: strategies toward neuroprotection*. J. Cell Mol. Med., 9, 85–102.
- Strong A.J., Venables G.S., Gibson G. (1983), *The cortical ischaemic penumbra associated with occlusion of the middle cerebral artery in the cat: 1. Topography of changes in blood flow, potassium ion activity, and EEG*. J. Cereb. Blood Flow Metab., 3, 86–96.
- Sun F.Y., Guo X. (2005), *Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor*. J. Neurosci. Res., 79, 180–184.
- Symon L., Branston N.M., Strong A.J., Hope T.D. (1977), *The concepts of thresholds of ischaemia in relation to brain structure and function*. J. Clin. Pathol. Suppl. (R. Coll. Pathol.), 11, 149–154.
- Szabo C., Dawson V.L. (1998), *Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion*. Trends Pharmacol. Sci., 19, 287–298.
- Takagi K., Ginsberg M.D., Globus M.Y., Dietrich W.D., Martinez E., Kraydieh S., Busto R. (1993), *Changes in amino acid neurotransmitters and cerebral blood flow in the ischemic penumbral region following middle cerebral artery occlusion in the rat*.

- correlation with histopathology*. J. Cereb. Blood Flow Metab., 13, 575–585.
- Traczyk W.Z. (2001), *Czynność mózgowia a środowisko wewnętrzne* [w:] Traczyk W.Z., Trzebski A. (red.), *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- von Lubitz D.K. (1999), *Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept?* Eur. J. Pharmacol., 371, 85–102.
- Wang X., Feuerstein G.Z. (2004), *The Janus face of inflammation in ischemic brain injury*. Acta Neurochir. Suppl., 89, 49–54.
- Weinstein P.R., Hong S., Sharp F.R. (2004), *Molecular identification of the ischemic penumbra*. Stroke, 35(suppl 1), 2666–2670.
- White B.C., Nayini N.R., Krause G.S., Aust S.D., March G.G., Bicknell J.S. 4th, Goosmann M. (1988), *Effect on biochemical markers of brain injury of therapy with deferoxamine or superoxide dismutase following cardiac arrest*. Am. J. Emerg. Med., 6, 569–576.
- White B.C., Sullivan J.M., DeGracia D.J., O'Neil B.J., Neumar R.W., Grossman L.I., Rafols J.A., Krause G.S. (2000), *Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanism of neuronal injury*. J. Neurol. Sci., 179, 1–33.
- Zhang Y., Widmayer M.A., Zhang B., Cui J.K., Baskin D.S. (1999), *Suppression of post-ischemic-induced fos protein expression by an antisense oligonucleotide to c-fos mRNA leads to increased tissue damage*. Brain Res., 832, 112–117.